

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 10255-Biotecon	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/06453	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02/09/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 02/09/1998
Anmelder  BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR ... et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. ---

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06453

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! ID: SPU97390 , Juli 1997 (1997-07) JANG: "SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE 40S RIBOSOMAL PROTEIN S4 HOMOLOG mRNA PARTIAL CDS" XP002133546 Zusammenfassung	1,2,4,5
X	DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: T36015, April 1997 (1997-04) ARUFFO ET AL.: "ANTISENSE PRIMER FOR SIGNAL PEPTIDE REGION OF HUMANISED ANTIBODY" XP002133547 Zusammenfassung	1,2,4,5

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. März 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online!  ID/AC: A42883, März 1997 (1997-03)  ABKEN ET AL: "SEQUENCE 15 FROM W09502701  "METHOD OF IDENTIFYING HUMAN AND ANIMAL  CELLS CAPABLE OF UNLIMITED PROLIFERATION  OR TUMOUR FORMATION"  XP002133548  Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online!  ID/AC: T47423, September 1997 (1997-09)  SHUBER: "PRIMER #4 FOR TAY-SACHS DISEASE  GENE"  XP002133549  Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE EMBL 'Online!  ID/AC: AA657460, November 1997 (1997-11)  EMMERT-BUCK: "Homo sapiens cDNA clone  IMAGE:1203441"  XP002133550  Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online!  ID/AC: Q20004, Dezember 1991 (1991-12)  MATTEUCCI: "TARGET DUPLEX FOR COVALENTLY  CROSS-LINKING OLIGONUCLEOTIDES"  XP002133551  Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1,2,4,5
X	<p>DOMANN ET AL.: "MOLECULAR CLONING,  SEQUENCING AND IDENTIFICATION OF A  METALLOPROTEASE GENE FROM LISTERIA  MONOCYTOGENES THAT IS SPECIES SPECIFIC AND  PHYSICALLY LINKED TO THE LISTERIOLYSIN  GENE"  INFECTION AND IMMUNITY,  Bd. 59, Nr. 1, 1991, Seiten 65-72,  XP002133545  in der Anmeldung erwähnt</p>	1,4,5
Y	<p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	2,3,6-12
Y	<p>ROSSEN L ET AL: "A RAPID POLYMERASE CHAIN  REACTION (PCR)-BASED ASSAY FOR THE  IDENTIFICATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES  IN FOOD SAMPLES"  INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD  MICROBIOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE  PUBLISHERS, AMSTERDAM,  Bd. 14, 1. Januar 1991 (1991-01-01),  Seiten 145-151, XP000198173  ISSN: 0168-1605  in der Anmeldung erwähnt</p> <p>---</p>	2,3,6-12

-/--

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06453

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 90 08841 A (GENE TRAK SYSTEMS) 9. August 1990 (1990-08-09) das ganze Dokument ----	
A	WO 92 01063 A (BIOLOG INC) 23. Januar 1992 (1992-01-23) das ganze Dokument ----	
A	WO 98 20160 A (HAZEL JAMES WILLIAM ; JENSEN MARK ANTON (US); DU PONT (US)) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument ----	
A	EP 0 576 842 A (MERCK PATENT GMBH) 5. Januar 1994 (1994-01-05) das ganze Dokument ----	
T	SCHEU ET AL.: "RAPID DETECTION OF LISTERIA MONOCYTOGENES BY PCR-ELISA" APPLIED MICROBIOLOGY, Bd. 29, Nr. 6, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 416-420, XP000892485 das ganze Dokument -----	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/06453

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9008841	A	09-08-1990	AU 5188190 A	24-08-1990
			CA 2025236 A	07-08-1990
			EP 0418346 A	27-03-1991
			JP 3504677 T	17-10-1991
			US 5376528 A	27-12-1994
WO 9201063	A	23-01-1992	US 5134063 A	28-07-1992
			AU 8230691 A	04-02-1992
			US 5374551 A	20-12-1994
WO 9820160	A	14-05-1998	US 5922538 A	13-07-1999
			AU 5100798 A	29-05-1998
			EP 0948643 A	13-10-1999
EP 0576842	A	05-01-1994	DE 4318450 A	16-12-1993
			JP 6233699 A	23-08-1994
			US 5932415 A	03-08-1999

## PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BOETERS, Hans, D.  
Boeters & Bauer  
Bereiteranger 15  
D-81541 München  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

30 March 2000 (30.03.00)

Applicant's or agent's file reference

10255-Biotecon

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/EP99/06453

International filing date (day/month/year)

02 September 1999 (02.09.99)

1. The following indications appeared on record concerning:



the applicant



the inventor



the agent



the common representative

Name and Address

BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR  
BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND  
CONSULTING MBH  
Tegeler Weg 33  
D-10589 Berlin  
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:



the person



the name



the address



the nationality



the residence

Name and Address

BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH  
Tegeler Weg 33  
D-10589 Berlin  
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:



the receiving Office



the International Searching Authority



the International Preliminary Examining Authority



the designated Offices concerned



the elected Offices concerned



other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Jocelyne Rey-Millet

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C. 20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 12 May 2000 (12.05.00)	
<b>International application No.</b> PCT/EP99/06453	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 10255-Biotecon
<b>International filing date</b> (day/month/year) 02 September 1999 (02.09.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 02 September 1998 (02.09.98)
<b>Applicant</b> SCHEU, Pia et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

30 March 2000 (30.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Nestor Santesso

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

1997  
09/786 011  
Translation  
5060

Applicant's or agent's file reference 10255-Biotecon	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/06453	International filing date (day/month/year) 02 September 1999 (02.09.99)	Priority date (day/month/year) 02 September 1998 (02.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 30 March 2000 (30.03.00)	Date of completion of this report 18 December 2000 (18.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/06453

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-17, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims, Nos. 1-12, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/06453

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	3, 6, 7, 9-12	YES
	Claims	1, 2, 4, 5, 8	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

1) The following documents are referred to:

- D1: DATABASE EMBL [Online] ID: SPU97390, July 1997 (1997-07);
- D2: DATABASE GENESEQ [Online] ID/AC: T36015, April 1997 (1997-04);
- D3: DATABASE EMBL [Online] ID/AC: A42883, March 1997 (1997-03);
- D4: DATABASE GENESEQ [Online] ID/AC: T47423, September 1997 (1997-09);
- D5: DATABASE EMBL [Online] ID/AC: AA657460, November 1997 (1997-11);
- D6: DATABASE GENESEQ [Online] ID/AC: Q20004, December 1991 (1991-12);
- D7: INFECTION AND IMMUNITY, Vol. 59, N° 1, 1991, pages 65-72, cited in the application;
- D8: INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Vol. 14, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 145-151, cited in the application.

2) The present application does not satisfy the requirements of PCT Article 33(2), because the subject matter of Claims 1, 2, 4, 5 and 8 is not

novel in relation to the prior art (PCT Rules 64.1 - 64.3) cited in the search report.

- a) D1-D7 (D1-D6: see abstracts; D7: see Figure 1) disclose nucleic acid molecules of various lengths (24 bases to 3767 bases) which deprive the subject matter of the above-mentioned claims of novelty. Since the applicants themselves appear to have attained different results from their sequence comparisons, the following is provided as an example:

D6 (sequence positions 37-51 ATTTCTTTTCTTTC) deprives sequences f and g in Claims 1 and 2 of novelty; for 15 successive nucleotides, the sequence defined in D6 is identical to certain claimed sequences and has a conventional length according to the definition given in Claim 2 for primers (10-250 nucleotides). The length of the oligonucleotides disclosed in Claim 1 is not limited.

- b) The kit described in Claim 8 has no features going beyond the above-mentioned nucleic acid molecules. In view of the broad wording of Claims 1-7, it is clear that the sequences defined in D1-D7 must likewise be suitable for analytical detection methods.
- 3) The present application does not satisfy the requirements of PCT Article 33(3), because the subject matter of Claims 1, 8 and 9, and likewise that of dependent Claims 2-7 and 10-12, does not involve an inventive step (PCT Rules 65.1 and 65.2).
- a) The closest prior art to Claim 9 (see also the present description, page 3, final paragraph, to page 4, second paragraph) appears in D7 (page 65, left-

hand column, final paragraph) and D8 ("Discussion"). These documents indicate that sequences coding for a metalloprotease (mpl) and situated downstream of the listeriolysin gene are unique to the pathogenic species *L. monocytogenes*.

The detection of pathogenic micro-organisms by means of characteristic nucleic acid sequences is a conventional approach in this technical field (see for example D8, *loc. cit.*).

Thus, a person skilled in the art and familiar with D7 and D8 would have sufficient reasons and guidance for selecting, from the proposed range of the mpl gene, nucleic acid molecules suitable for the detection of *listeria monocytogenes*. The criteria and test procedures involved would appear to be routine measures for a person skilled in the art. Thus, a person skilled in the art would arrive at the claimed subject matter with a strong expectation of success.

The nucleic acid molecules of Claims 1-8 appear to be simply the result of an arbitrary choice from numerous possibilities within the mpl gene. There is no experimental data to make it credible that the specific claimed sequences solve a technical problem in an unexpected manner. It is neither apparent nor foreseeable that other possible primers belonging to the mpl gene would not provide highly specific detection.

- b) For similar reasons, the sequences in Claims 1, 2 and 8 to which the objection regarding novelty does not apply fail to satisfy the requirement of an inventive step.

- c) The additional features mentioned in dependent Claims 6, 7 and 10-12 merely represent conventional measures in the technical field in question.
- d) In their attempt to establish an inventive step for the subject matter of the claims, the applicants (see letter of 4 August 2000, page 5) argue that if no specific indication were provided as to which regions of the *mpl* gene are suitable as specific primers or as samples, a person skilled in the art would have to systematically test a large number of sequences. This the applicants consider to be a virtually hopeless undertaking. The applicants also concede that the possibility that other oligonucleotide sequences suitable as primers or samples exist within the *mpl* gene can not be excluded. The applicants consider that the discovery of such sequences could constitute an entirely independent invention.

In the light of that reasoning, it is likely that an objection of lack of unity of invention (PCT Article 13) would have to be raised, on several grounds, in subsequent national or regional proceedings.

In that case, given the objections raised above regarding novelty and inventive step, the various claimed sequences could probably not be considered as representing the same or equivalent special technical features. The claimed kits and uses would represent further groups of inventions (see PCT Examination Guidelines, Chapter III-4.7).

- 4) Contrary to the view expressed by the applicants in their written response, the discovery of

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/EP 99/06453

oligonucleotides with a length of 17 to 35  
nucleotides is not covered the present claims.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/06453

## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii),  
neither D1-D6 nor the relevant prior art disclosed in  
those documents has been mentioned in the description.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/06453

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- 1) Indefinite features, such as "a length that is normal for samples or primers" (Claim 2), "whereby the nucleic acid molecule [...] is modified [...] in a manner that is known per se" (Claim 5), "similar building blocks known per se" (Claim 6), or "similar in structure to a nucleic acid" (Claim 7), are not apt to establish a distinction from the prior art, and they render the scope of the claims in question unclear (PCT Article 6).
- 2) The optional features in Claims 2 and 5-8, which are preceded by the words "preferably", "optionally" or "in particular", create a lack of clarity with regard to the scope of the subject matter to be protected (PCT Article 6; see also PCT Examination Guidelines, Chapter III-4.6).



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/EP 99/06453

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! ID: SPU97390, July 1997 (1997-07) JANG: "SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE 40S RIBOSOMAL PROTEIN S4 HOMOLOG mRNA PARTIAL CDS" XP002133546 abstract	1,2,4,5
X	DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: T36015, April 1997 (1997-04) ARUFFO ET AL.: "ANTISENSE PRIMER FOR SIGNAL PEPTIDE REGION OF HUMANISED ANTIBODY" XP002133547 abstract	1,2,4,5

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March 2000

Date of mailing of the international search report

06/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.  
PCT/EP 99/06453

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! ID/AC: A42883, March 1997 (1997-03) ABKEN ET AL: "SEQUENCE 15 FROM W09502701 "METHOD OF IDENTIFYING HUMAN AND ANIMAL CELLS CAPABLE OF UNLIMITED PROLIFERATION OR TUMOUR FORMATION" XP002133548 abstract	1,2,4,5
X	DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: T47423, September 1997 (1997-09) SHUBER: "PRIMER #4 FOR TAY-SACHS DISEASE GENE" XP002133549 abstract	1,2,4,5
X	DATABASE EMBL 'Online! ID/AC: AA657460, November 1997 (1997-11) EMMERT-BUCK: "Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1203441" XP002133550 abstract	1,2,4,5
X	DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: Q20004, December 1991 (1991-12) MATTEUCCI: "TARGET DUPLEX FOR COVALENTLY CROSS-LINKING OLIGONUCLEOTIDES" XP002133551 abstract	1,2,4,5
X	DOMANN ET AL.: "MOLECULAR CLONING, SEQUENCING AND IDENTIFICATION OF A METALLOPROTEASE GENE FROM LISTERIA MONOCYTOGENES THAT IS SPECIES SPECIFIC AND PHYSICALLY LINKED TO THE LISTERIOLYSIN GENE" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 59, no. 1, 1991, pages 65-72, XP002133545 cited in the application	1,4,5
Y	the whole document	2,3,6-12
Y	ROSSEN L ET AL: "A RAPID POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)-BASED ASSAY FOR THE IDENTIFICATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN FOOD SAMPLES" INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 14, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 145-151, XP000198173 ISSN: 0168-1605 cited in the application	2,3,6-12
	-/-	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.  
PCT/EP 99/06453

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 08841 A (GENE TRAK SYSTEMS) 9 August 1990 (1990-08-09) the whole document	
A	WO 92 01063 A (BIOLOG INC) 23 January 1992 (1992-01-23) the whole document	
A	WO 98 20160 A (HAZEL JAMES WILLIAM ; JENSEN MARK ANTON (US); DU PONT (US)) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document	
A	EP 0 576 842 A (MERCK PATENT GMBH) 5 January 1994 (1994-01-05) the whole document	
T	SCHEU ET AL.: "RAPID DETECTION OF LISTERIA MONOCYTOGENES BY PCR-ELISA" APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 29, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 416-420, XP000892485 the whole document	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int'l. Application No  
PCT/EP 99/06453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9008841 A	09-08-1990	AU 5188190 A CA 2025236 A EP 0418346 A JP 3504677 T US 5376528 A	24-08-1990 07-08-1990 27-03-1991 17-10-1991 27-12-1994
WO 9201063 A	23-01-1992	US 5134063 A AU 8230691 A US 5374551 A	28-07-1992 04-02-1992 20-12-1994
WO 9820160 A	14-05-1998	US 5922538 A AU 5100798 A EP 0948643 A	13-07-1999 29-05-1998 13-10-1999
EP 0576842 A	05-01-1994	DE 4318450 A JP 6233699 A US 5932415 A	16-12-1993 23-08-1994 03-08-1999

M.H

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C12Q 1/68</b></p>	<p><b>A2</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/14276</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. März 2000 (16.03.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06453</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 2. September 1999 (02.09.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 40 044.6      2. September 1998 (02.09.98)      US</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHEU, Pia [DE/DE]; Boelckestrasse 45, D-12101 Berlin (DE). GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, D-13359 Berlin (DE). BERGHOF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländerweg 85, D-12355 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters &amp; Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Title: OLIGO NUCLEOTIDES, METHOD AND KIT FOR DETECTING <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> BY AMPLIFYING AND/OR HYBRIDIZING NUCLEIC ACIDS</p> <p>(54) Bezeichnung: OLIGONUKLEOTIDE, VERFAHREN UND KIT ZUR DETEKTION VON <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> DURCH NUKLEINSÄUREAMPLIFIKATION UND/ODER -HYBRIDISIERUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a nucleic acid molecule or molecules and to a method for the quick and sensitive detection of bacteria of the pathogenic species <i>Listeria monocytogenes</i>. The invention also relates to a test kit or test kits for carrying out said detection method.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum schnellen und sensitiven Nachweis von Bakterien der pathogenen Spezies <i>Listeria monocytogenes</i>. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Oligonukleotide, Verfahren und Kit zur Detektion von *Listeria monocytogenes* durch Nukleinsäureamplifikation und/oder -hybridisierung**

Erfindungsgemäß werden Oligonukleotide, Verfahren und Kit zur Detektion von *Listeria monocytogenes* durch Nukleinsäureamplifikation und/oder -hybridisierung bereitgestellt.

Die Gattung *Listeria* besteht aus den sechs Spezies *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seligeri* und *L. welshimeri*. Unter diesen sind nur Stämme der Spezies *L. monocytogenes* pathogen für den Menschen, insbesondere für Immungeschwächte, Ältere und Neugeborene. Die häufigsten Symptome der Listeriose sind Septikämie, Meningitis und Fehlgeburten. Infektionen durch *L. monocytogenes* werden vor allem durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel verursacht, insbesondere von Milchprodukten, Fleisch, Geflügel und Gemüse.

Eine Vielzahl von Verfahren zur Detektion von *L. monocytogenes* sind bekannt. Konventionelle Detektionsverfahren für *L. mono-*

cytogenes bestehen aus einer Voranreicherung und nachfolgender Isolation von Kolonien auf Selektivmedien (Lovett et al., J. Food Protection 50 (1987), 188-192; McClain & Lee, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71 (1988), 660-664). Einzelkolonien werden nach ihrer Morphologie bzw. nach biochemischen oder serologischen Eigenschaften untersucht. Die Durchführung einer Analyse kann bis zu 6 - 8 Tagen in Anspruch nehmen.

Da vor allem leicht verderbliche Nahrungsmittel häufig mit *L. monocytogenes* kontaminiert sind, wurden verschiedene Schnellverfahren zur Detektion von *L. monocytogenes* entwickelt. Diese Verfahren basieren entweder auf immunologischen Methoden oder der Anwendung von Nukleinsäuresonden.

Dabei kann die Detektion durch direkte Hybridisierung von Sonden an keimspezifische DNA bzw. RNA erfolgen (siehe z.B. Datta, A. R. et al., Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987), 2256-2259). Der Nachteil bei solchen Verfahren ist die geringe Sensitivität, da mindestens  $10^5$ - $10^6$  Kopien der Zielnukleinsäure erforderlich sind. Dies kann durch Kombination mit einer Vervielfältigung der Zielsequenz, z.B. durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), ausgeglichen werden. Mehrere PCR-Verfahren zum Nachweis von *L. monocytogenes* sind in der Literatur beschrieben [zur Übersicht siehe z.B. Jones, D.D. & Bej, A.K. in "PCR Technology, Current Innovations", Griffin, H.G. & Griffin, A.M., Hrsg., (1994), 341-365]. Siehe auch die US Patente 4,683,195; 4,683,202 und 4,965,188. Ferner können die Ligase-Kettenreaktion [WO Veröffentlichung 89/09835], die „self-sustained sequence replication“ [EP 329,822], das „transcription based amplification system“ [EP 310,229] und das Q $\beta$  RNA-Replikase-System [US Patent 4,957,858] zur Amplifikation von Nukleinsäuren eingesetzt werden.



Es sind auch bereits einige Testkits zur Detektion mittels Antikörpern kommerziell erhältlich. Die meisten dieser Tests zeigen jedoch nur eine geringe Sensitivität und Spezifität.

Zur Detektion von spezifischen Mikroorganismen mittels Nukleinsäure-Hybridisierung oder -Amplifikation werden üblicherweise keimspezifische Oligonukleotide verwendet, deren Basensequenz für die DNA oder RNA eines spezifischen Mikroorganismus oder einer Gruppe von Mikroorganismen charakteristisch ist. Eine Hybridisierung an die DNA/RNA bzw. eine Amplifikation von DNA/RNA bei Einsatz dieser keimspezifischen Oligonukleotide (z.B. als Primer oder Sonden) mit den oben genannten Verfahren kann, unter geeigneten Reaktionsbedingungen, nur dann erfolgen, wenn die DNA/RNA der jeweils nachzuweisenden Mikroorganismen anwesend ist.

Die für *L. monocytogenes* beschriebenen Nachweisverfahren basieren überwiegend auf solchen Zielgenen, die eine Rolle in der Pathogenität von *L. monocytogenes* spielen. Es ist bekannt, daß einige dieser Gene in einem Virulenz-Gencluster benachbart auf dem Chromosom angeordnet sind. Da das Listeriolysin-Gen (*hlyA*) zuerst als eindeutig notwendig für die Pathogenität von *L. monocytogenes* erkannt wurde (Cossart, P. et al., Infect. Immun. 57 (1989), 3629-3636), basieren die meisten genotypischen Nachweisverfahren auf diesem Gen. Das *hlyA*-Gen kommt jedoch mit hoher Homologie auch bei apathogenen Listerien vor (i.e. bei *L. seeligeri* und *L. ivanovii*). Das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen ist bei diesen Nachweisverfahren nicht mit vollständiger Sicherheit auszuschließen, da einzelne Punktmutationen im Bereich der Bindungsstellen von Primern oder Sonden hierzu bereits ausreichen können.

Für das dem *hlyA*-Gen im Genom direkt benachbarte Metalloprotease-Gen (*mpl*) konnte gezeigt werden, daß es nur bei *L. mono-*

cytogenes vorkommt, also nicht bei apathogenen Listerien (Dommann, E. et al., Infect. Immun. 59 (1991), 65-72).

Die prinzipielle Eignung der das hlyA-Gen flankierenden DNA-Region zum Nachweis von *L. monocytogenes* mittels Hybridisierung oder Amplifikation ist beschrieben (Rossen, L. et al., Int. J. Food Microbiol. 14 (1991), 145-152), jedoch sind bisher für solche Nachweisverfahren keine Oligonukleotidsequenzen publiziert worden.

Die Sequenz des mpl-Gens von *L. monocytogenes* ist in der EMBL Datenbank unter der Accession Nummer X54619 beschrieben [Dommann, E. et al., Infect. Immun. 59 (1991), 65-72]. Desweiteren sind Teile der Sequenz des mpl-Gens von *L. monocytogenes* in der EMBL Datenbank unter der Accession Nummer X60035 aufgeführt [Rasmussen, O. F. et al., Infect. Immun. 59 (1991), 3945-3951].

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es nun, ein routinegeeignetes Nachweisverfahren zu entwickeln, bei dem auch unter stark schwankenden Versuchsbedingungen beim jeweiligen Anwender die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten falsch-positiver Ergebnisse möglichst gering ist.

Insbesondere sollen Oligonukleotidsequenzen bereitgestellt werden, die in einem Nachweisverfahren für das Metallprotease-Gen (mpl) von *L. monocytogenes* eingesetzt werden können.

Diese Aufgaben werden durch die Bereitstellung von Nukleinsäuremolekülen der Sequenzen

- (i) 5'-GAA AAA GCA TTT GAA GCC AT-3' oder
- (ii) 5'-GCA ACT TCC GGC TCA GC-3' oder
- (iii) 5'-TCG AAA AAG CAT TTG AAG CC-3' oder
- (iv) 5'-GGT CAG AGT GAA GCT CAT GT-3' oder
- (v) 5'-CTT TTC ACA TGA GCT TCA CTC TGA CCA A-3' oder

- (vi) 5'-CTT TTT CTT TCA CTG GGT TTC CGA CAT-3' oder  
(vii) 5'-GAT GAT TTC TTT TTC TTT CAC TGG ATT TCC AAT AT-3'  
oder  
(viii) der zu (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) und (vii)  
jeweils komplementären Sequenz. *gelöst.*

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können wie folgt definiert sein:

Oligonukleotid LM1: (Sequenz (i) = SEQ ID NO 1 entspricht der Position 2476 bis 2495 von *L. monocytogenes* [nach Domann, E. et al. Infect. Immun. 59 (1991), 65-72].

Oligonukleotid LM 2: (Sequenz (ii) = SEQ ID NO 2) entspricht der Position 2608 bis 2624 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LM 3: (Sequenz (iii) = SEQ ID NO 3) entspricht der Position 2474 bis 2493 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LM 4 (Sequenz (iv) = SEQ ID NO 4) entspricht der Position 2497 bis 2516 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LMR 1: (Sequenz (v) = SEQ ID NO 5) entspricht der Position 2495 bis 2522 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LMF 1: (Sequenz (vi) = SEQ ID NO 6) entspricht der Position 2525 bis 2551 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LMF 2 (Sequenz (vii) = SEQ ID NO 7) entspricht der Position 2525 bis 2559 von *L. monocytogenes*.

Zur Untersuchung, inwieweit Sequenzvariationen des *mpl*-Gens innerhalb der Spezies *L. monocytogenes* auftreten, wurde ein internes Fragment von 300 Basenpaaren von 13 *L. monocytogenes* Stämmen verschiedener Serovaren (2 Stämme der Serovaren 1/2a, 1 Stamm des Serovars 1/2b, 1 Stamm des Serovars 1/2c, 1 Stamm des Serovars 3a, 1 Stamm des Serovars 3b, 1 Stamm des Serovars 3c, 1 Stamm des Serovars 4a, 1 Stamm des Serovars 4a/b, 1 Stamm des Serovars 4b, 1 Stamm des Serovars 4c, 1 Stamm des Serovars 4d und 1 Stamm des Serovars 7) sequenziert. Anhand der Sequenzvergleiche wurde überraschenderweise gefunden, daß die

Oligonukleotide LM1, LM 2, LM3, LM 4, LMF 1, LMF 2, LMR 1 sowie dazu komplementäre Sequenzen in Nachweisverfahren für *L. monocytogenes* zu hoch-spezifischen Nachweisen führen. Dabei werden die Oligonukleotide LM1, LMR1, LMF1 und LMF2 bzw. die dazu komplementären Sequenzen vorzugsweise als Sonden verwendet.

Erfindungsgemäß werden insbesondere Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie bezüglich mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden ihrer Nukleotidkette

- (a) mit 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle (i) bis (viii) identisch sind oder
- (b) mit 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle (i) bis (viii) übereinstimmen oder
- (c) mit 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle (i) bis (viii) übereinstimmen oder
- (d) zu mindestens 90 % mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 homolog sind.

Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können eine für Sonden oder Primer übliche Länge aufweisen, insbesondere für eine PCR-Reaktion, sie können ferner eine durch Amplifikation, insbesondere durch eine PCR-Reaktion, herstellbare Länge aufweisen, und vorzugsweise können sie 10 bis 250 Basen und insbesondere 15 bis 30 Basen lang sein.

Sie können einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegen.

Geeignet als erfindungsgemäße keimspezifische Oligonukleotide zum Nachweis von *L. monocytogenes* sind also Nukleinsäuren, vorzugsweise 10 bis 250 Basen und insbesondere 15 bis 30 Basen lang, die mindestens in einer 10 Basen langen Sequenz mit den

angegebenen Sequenzen LM 1, LM 2, LM 3, LM 4, LMF 1, LMF 2 und LMR 1 oder den hierzu komplementären Sequenzen übereinstimmen. Geringere Abweichungen (1 bis 2 Basen) in dieser 10 Basen langen Sequenz sind möglich, ohne daß die jeweils angegebene Spezifität bei der Amplifikation und/oder Hybridisierung verloren geht. Dem Fachmann ist bekannt, daß im Falle solcher geringeren Abweichungen die Reaktionsbedingungen entsprechend verändert werden müssen; vgl. beispielsweise T. Maniatis, Molecular Cloning, Herausgeber G. Sambrook & E.F. Fritsch, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

Zum Nachweis von *L. monocytogenes* werden Nukleinsäuren, vorzugsweise genomische DNA, zunächst aus den in einer zu untersuchenden Probe bzw. Bakterienkultur enthaltenen Zellen freigesetzt. Mittels Nukleinsäure-Hybridisierung kann dann, und zwar unter Einsatz der erfindungsgemäßen keimspezifischen Oligonukleotide als Sonde, der direkte Nachweis von keimspezifischen Nukleinsäuresequenzen in der zu untersuchenden Probe erfolgen. Geeignet hierzu sind verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren, wie z.B. "Southern blot" oder "dot blot".

Bevorzugt ist jedoch, vor allem wegen der höheren Empfindlichkeit, ein indirektes Nachweisverfahren, bei dem die gesuchten und wie vorstehend beschriebenen freigesetzten DNA/RNA-Sequenzen zunächst mittels der o.g. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, vorzugsweise PCR, amplifiziert werden.

Die Amplifikation von DNA/RNA unter Verwendung der genannten Verfahren erfolgt unter Einsatz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle als Primer. Dabei werden nur in dem Fall spezifische Amplifikate gebildet, in dem DNA/RNA von *L. monocytogenes* anwesend ist. Durch eine Detektionsreaktion (nachgeschaltet bzw. während der Amplifikations-Reaktion) unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle als Sonden kann die Spezifität des Nachweisverfahrens erhöht

werden. Für diese Detektionsreaktion ist ebenso die Verwendung von nicht vollständig keimspezifischen Oligonukleotiden möglich.

Alternativ kann die Nukleinsäure-Amplifikation auch in Anwesenheit eines oder mehrerer nicht vollständig spezifischer Oligonukleotide durchgeführt werden, so daß möglicherweise auch DNA/RNA anderer, nicht-nachzuweisender Mikroorganismen amplifiziert werden kann. Ein derartiges Amplifikationsverfahren ist in der Regel weniger spezifisch und sollte daher durch eine Detektionsreaktion (nachgeschaltet oder während der Amplifikations-Reaktion) mit einem oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül(e) als Sonde(n) abgesichert werden.

Erfindungsgemäß können verschiedene Verfahren eingesetzt werden, um die bei den indirekten Verfahren entstehenden Amplifikationsprodukte nachzuweisen. Dazu gehören u.a. an sich bekannte Verfahren wie die Visualisierung mittels Gelelektrophorese, die Hybridisierung von Sonden an immobilisierte Reaktionsprodukte [gekoppelt an Nylon- oder Nitrocellulose-Filter ("Southern blots") oder z.B. an "beads" oder Mikrotiterplatten] und die Hybridisierung der Reaktionsprodukte an immobilisierte Sonden (z.B. "reverse dot blots" oder mit Sonden gekoppelte "beads" oder Mikrotiterplatten). Zudem können Verfahren eingesetzt werden, bei dem ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle als Sonden im Verlauf der PCR-Reaktion („online“) spezifisch entstehende Amplifikationsprodukte qualitativ und quantitativ nachweisen können.

*Es gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten*  
Erfindungsgemäß ~~können eine Vielzahl verschiedener an sich bekannter Varianten eingesetzt werden~~, mit denen die erfindungsgemäßen Oligonukleotide (z.B. Sonden und Primer) für die beschriebenen direkten oder indirekten Nachweisverfahren



markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige, fluoreszierende oder anderweitig modifizierte bzw. modifizierende Gruppen enthalten, beispielsweise Antikörper, Antigene, Enzyme bzw. andere Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen. Sonden bzw. Primer können entweder natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte doppelsträngige oder einzelsträngige DNA oder RNA bzw. modifizierte Formen von DNA oder RNA, wie z.B. PNA sein (bei diesen Molekülen sind die Zucker-Einheiten durch Aminosäuren oder Peptide ausgetauscht). Einzelne oder mehrere Nukleotide der erfindungsgemäßen Sonden oder Primer können gegen analoge Bausteine (wie z.B. Nukleotide, die in der Ziel-Nukleinsäure nicht natürlich vorkommen) ersetzt sein. Insbesondere können bis zu 20 % von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden einer Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analöge Bausteine ersetzt werden.

Bei den o.g. indirekten Nachweisverfahren kann Detektion auch über ein intern-markiertes Amplifikat geführt werden. Dies kann z.B. über den Einbau von modifizierten (z.B. an Digoxigenin oder an Fluorescein gekoppelten) Nukleosidtriphosphaten während der Amplifikationsreaktion erfolgen.

Weiter wird erfindungsgemäß ein Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes*, bereitgestellt, der ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle enthält.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle bzw. die entsprechenden Kits können in einem Verfahren zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien der Spezies *L. monocytogenes* in einer Probe verwendet werden, wobei es sich bei dem Verfahren vorzugsweise um eine Nukleinsäurehybridisierung und/oder eine Nukleinsäureamplifikation, wie eine PCR, handelt.

Dabei können nachzuweisende Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle unterschieden werden.

### Beispiel

**Beispiel 1:** Nachweis von Bakterien der Spezies *L. monocytogenes* mit der Polymerase-Kettenreaktion

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 10 bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurde dann in Gegenwart von je 0,4 µM Oligonukleotid LM 1 und LM 2, oder LM 3 und LM 2, 200 µM dNTP's (Boehringer Mannheim), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01% Tween 20 und 0,03 U/µl Taq DNA Polymerase (Biomaster) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 Zyklen	94 °C	30 sec
	57 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
Finale Synthese	72 °C	5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Die erwarteten Produkte von 149 bp bzw. 151 bp Länge wurden nur in den Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Spezies *L. monocytogenes* anwesend war. Die in den Gelen aufgetrennte DNA wurde mittels Standard-Methoden auf Nylon Filter transferiert und zur Überprüfung der Spezifität mit dem am 5'-Ende Digoxigenin-markier-



ten Oligonukleotid LM 4 (Sequenz 4) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5 x SSC, 2 % Blocking Reagenz, 0,1 % Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS und 5 pmol/ml Sonde für 4 h bei 60 °C. Gewaschen wurde in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 2 x 10 min bei 60 °C. Die Detektion erfolgte nach Standard-Methoden mittels Alkalischer Phosphatase Konjugate (Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment, Fa. Boehringer Mannheim) in Anwesenheit von 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Fa. Boehringer Mannheim).

Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor eine Bande von 149 bp bzw. 151 bp auf dem Agarosegel sichtbar war. Somit wurde mittels PCR und Hybridisierung die Anwesenheit sämtlicher 103 getesteten *L. monocytogenes* - Stämme nachgewiesen. Hingegen wurde keiner der getesteten nicht zu dieser Spezies gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfaßt.

**Tabelle 1:** Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden LM 1 und LM 2 (SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 2) bzw. LM 3 und LM 2 (SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 2) und jeweils nachfolgender Hybridisierung mit dem Oligonukleotid LM4 (SEQ ID NO 4)

Spezies	Serovar	Stamm-bezeichnung	LM1/LM2	LM2/LM3
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 767	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 768	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 5877	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 5828	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 6199	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		DSM 20650	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 5921	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7303	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7309	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7329	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 3954	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		DSM 20751	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 5326	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7160	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7161	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7167	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7168	-	-
<i>Listeria innocua</i>		DSM 20649	-	-

<i>Listeria innocua</i>		SLCC 3408	-	-
<i>Listeria innocua</i>		NCTC 10528	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7139	-	-
<i>Listeria grayi</i>		DSM 20601	-	-
<i>Listeria grayi</i>		DSM 20596	-	-
<i>Listeria grayi</i>		BC 7308	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		DSM 20750	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2028	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2098	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2102	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2379	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 4121	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 4706	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 4770	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 5378	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		ATCC 19119	-	-
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19111	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19112	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19113	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19114	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19115	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19116	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19117	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19118	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 53	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 2479	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 2482	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 5835	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 4955	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 6204	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7149	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7150	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7153	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7165	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7195	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7196	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7197	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7198	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7973	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7053	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7054	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7055	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 6031	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7163	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7151	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7152	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7354	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7367	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7059	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 4950	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 6793	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7154	+	+

<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7290	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7352	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7355	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 4949	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7135	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7179	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 2540	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7140	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7381	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 c	SLCC 2471	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5069	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5070	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7083	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7065	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7069	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 4013	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7194	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7356	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7370	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7372	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7373	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7374	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 788	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7056	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7057	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7058	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7060	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7061	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7062	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7063	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7064	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7066	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7067	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7068	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7069	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7070	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7071	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7072	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7073	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7074	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7075	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7076	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7077	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7078	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7079	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7080	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7081	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7082	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7084	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7085	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7086	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7087	+	n.d.

<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7088	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7089	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7090	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7091	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7092	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4925	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4954	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6277	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6813	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6821	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6823	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 2375	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4926	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4952	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	7	SLCC 2622	+	+
<i>Arthrobacter spec.</i>		DSM 312	-	n.d.
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6051	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>		DSM 30040	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>		DSM 4595	-	n.d.
<i>Clostridium bifermentans</i>		DSM 630	-	n.d.
<i>Clostridium sporogenes</i>		IfGB 0303	-	n.d.
<i>Enterobacter agglomerans</i>		IfGB 0202	-	n.d.
<i>Enterobacter cloacae</i>		DSM 30054	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>		BC 674	-	n.d.
<i>Erwinia carotovora</i>		DSM 30168	-	n.d.
<i>Escherichia coli</i>		DSM 30083	-	n.d.
<i>Hafnia alvei</i>		IfGB 0101	-	n.d.
<i>Klebsiella oxytoca</i>		DSM 5175	-	n.d.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		DSM 2026	-	n.d.
<i>Lactobacillus spec.</i>		IfGB 1401	-	n.d.
<i>Lactob. bifermentans</i>		BC 8463	-	-
<i>Leuconostoc carnosum</i>		DSM 5576	-	n.d.
<i>Leucon. mesenteroides</i>		DSM 2146	-	n.d.
<i>Micrococcus citreus</i>		IfGB 0601	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>		DSM 348	-	-
<i>Pediococcus damnosus</i>		BC 505	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>		IfGB 51	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>		DSM 2041	-	n.d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 10145	-	n.d.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		IfGB 0301	-	-
<i>Salmonella spec.</i>		BC 2426	-	n.d.
<i>Salmonella typhimurium</i>		BC 2157	-	n.d.
<i>Serratia marcescens</i>		BC 677	-	-
<i>Shigella flexneri</i>		DSM 4782	-	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 6538	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i>		DSM 20380	-	n.d.
<i>Strept. faecalis</i>		DSM 20478	-	n.d.
<i>Strept. diacetylactis</i>		BC 2149	-	-
<i>Strept. thermophilus</i>		DSM 20259	-	n.d.
<i>Yersinia enterocolitica</i>		DSM 4780	-	n.d.

IfGB: Institut für Gärungsgewerbe Berlin



BC: BioteCon Stammsammlung  
SLCC: H.P.R. Seeliger Listeria Culture Collection, Würzburg  
ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA  
DSM: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen  
GmbH, Braunschweig  
n.d.: nicht durchgeführt

**Beispiel 2:** Online-Detektion von Bakterien der Spezies *L. monocytogenes* mit der Polymerase-Kettenreaktion

Aus Reinkulturen der in Tabelle 2 aufgeführten Stämme und Isolate wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 100 fg bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurden dann in Gegenwart von je 0,4 µM Oligonukleotid LM 1 und LM 2, je 0,2 µM LMF 1 (Markierung: 3'-Fluorescein), LMF 2 (Markierung: 3'-Fluorescein) und LMR 1 (Markierung: 5'-LC Red640 (Roche Diagnostics), 3'-Phosphat), 200 µM dNTP's (Roche Diagnostics), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 µg/µl BSA (Roche Diagnostics), 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01% Tween 20 und 0,04 U/µl Taq DNA Polymerase (HTB) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem LightCycler der Firma Roche Diagnostics GmbH mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
42 Zyklen	97 °C	0 sec
	59 °C	40 sec

Während der PCR-Reaktion wurden Fluoreszenz-Signale (Detektions-Wellenlänge 640 nm) nur in den Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Spezies *L. monocytogenes* anwesend war.

**Tabelle 2:** Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden LM 1 und LM 2 (SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 2) und jeweils während der Amplifikationsreaktion erfolgenden Hybridisierung mit den Oligonukleotiden LMF1, LMF2 und LMR1 (SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 )

Spezies	Serovar	Stamm-be- zeichnung	LM1/LM2 LMF1/LMF2/LMR1
<i>Bacillus staerotherophilus</i>		DSM 456	-
<i>Staphylococcus aureus</i>		BC 197	-
<i>Escherichia coli</i> (VTEC)		BC 8318	-
<i>Clostridium perfringens</i>		BC 8799	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		DSM 20241	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 767	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 768	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 5877	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 5921	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7309	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 5326	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7160	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7161	-
<i>Listeria grayi</i>		DSM 20601	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2028	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2098	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2102	-
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 4955	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 6204	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7149	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7150	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7153	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7151	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7152	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7354	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7367	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7059	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 6793	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7154	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7290	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7352	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7355	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 4949	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7135	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7179	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7140	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7381	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 c	SLCC 2471	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5069	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5070	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7083	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7065	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7069	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 4013	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7194	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7356	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7370	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7372	+

<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4925	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4954	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6277	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6813	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6821	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 2375	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4926	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4952	+
<i>L. monocytogenes</i>	7	SLCC 2622	+

IfGB: Institut für Gärungsgewerbe Berlin

BC: BioteCon Stammsammlung

SLCC: H.P.R. Seeliger Listeria Culture Collection, Würzburg

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA

DSM: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen  
GmbH, Braunschweig

## Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, dadurch **gekennzeichnet**, daß es bezüglich mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette

(i) mit 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Nukleinsäuremoleküle gemäß a), b), c), d), e), f), g) oder h) identisch ist:

a) der SEQ ID NO 1 5'-GAA AAA GCA TTT GAA GCC AT-3' oder

b) der SEQ ID NO 2 5'-GCA ACT TCC GGC TCA GC-3' oder

c) der SEQ ID NO 3 5'-TCG AAA AAG CAT TTG AAG CC-3' oder

d) der SEQ ID NO 4 5'-GGT CAG AGT GAA GCT CAT GT-3' oder

e) der SEQ ID NO 5 5'-CTI TTC ACA TGA GCT TCA CTC TGA  
CCR A-3' oder

f) der SEQ ID NO 6 5'-CTT TTT CTT TCA CTG GGT TTC CGA  
CAT-3' oder

g) der SEQ ID NO 7 5'-GAT GAT TTC TTT TTC TTT CAC TGG ATT  
TCC AAT AT-3' oder

h) der zu a), b), c), d), e), f) und g) jeweils komplementären Sequenz; oder



- (ii) mit 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Nukleinsäuremoleküle gemäß (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) oder (h) übereinstimmt oder
- (iii) mit 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Nukleinsäuremoleküle gemäß (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) oder (h) übereinstimmt oder
- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) oder (h) homolog ist.

2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, **gekennzeichnet** durch eine für Sonden oder Primer übliche Länge, insbesondere für eine PCR-Reaktion, insbesondere eine Länge von 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden.

### 3. Nukleinsäuremolekül

- a) der SEQ ID NO 1 5'-GAA AAA GCA TTT GAA GCC AT-3' oder
- b) der SEQ ID NO 2 5'-GCA ACT TCC GGC TCA GC-3' oder
- c) der SEQ ID NO 3 5'-TCG AAA AAG CAT TTG AAG CC-3' oder
- d) der SEQ ID NO 4 5'-GGT CAG AGT GAA GCT CAT GT-3' oder
- e) der SEQ ID NO 5 5'-CTI TTC ACA TGA GCT TCA CTC TGA  
CCR A-3' oder
- f) der SEQ ID NO 6 5'-CTT TTT CTT TCA CTG GGT TTC CGA  
CAT-3' oder
- g) der SEQ ID NO 7 5'-GAT GAT TTC TTT TTC TTT CAC TGG ATT  
TCC AAT AT-3' oder
- h) der zu a), b), c), d), e), f) und g) jeweils komplementären Sequenz.

4. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.

5. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es

- (i) als DNA-Sequenz oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA-Sequenz oder
- (iii) als PNA-Sequenz vorliegt,

wobei das Nukleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

6. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß bis zu 20 % von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

7. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nukleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

8. Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes*,

**gekennzeichnet** durch ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.

9. Verwendung eines oder mehrerer Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder eines Kits gemäß Anspruch 8 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes*.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Nukleinsäurehybridisierung und/oder eine Nukleinsäureamplifikation durchführt.

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion für die Nukleinsäureamplifikation durchführt.

12. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines der Nukleinsäuremoleküle gemäß Anspruch 3 unterscheidet.

# INTERNATIONALE RESEARCHERBERICHT

Int. Antragszeichen

PCT/EP 99/06453

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ID: SPU97390, Juli 1997 (1997-07) JANG: "SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE 40S RIBOSOMAL PROTEIN S4 HOMOLOG mRNA PARTIAL CDS" XP002133546 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: T36015, April 1997 (1997-04) ARUFFO ET AL.: "ANTISENSE PRIMER FOR SIGNAL PEPTIDE REGION OF HUMANISED ANTIBODY" XP002133547 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipie oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. März 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

06/04/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

# INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Int. Sonales Alderzeichen  
PCT/EP 99/06453

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ID/AC: A42883, März 1997 (1997-03) ABKEN ET AL: "SEQUENCE 15 FROM W09502701 "METHOD OF IDENTIFYING HUMAN AND ANIMAL CELLS CAPABLE OF UNLIMITED PROLIFERATION OR TUMOUR FORMATION" XP002133548 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: T47423, September 1997 (1997-09) SHUBER: "PRIMER #4 FOR TAY-SACHS DISEASE GENE" XP002133549 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ID/AC: AA657460, November 1997 (1997-11) EMMERT-BUCK: "Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1203441" XP002133550 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: Q20004, Dezember 1991 (1991-12) MATTEUCCI: "TARGET DUPLEX FOR COVALENTLY CROSS-LINKING OLIGONUCLEOTIDES" XP002133551 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
X	<p>DOMANN ET AL.: "MOLECULAR CLONING, SEQUENCING AND IDENTIFICATION OF A METALLOPROTEASE GENE FROM LISTERIA MONOCYTOGENES THAT IS SPECIES SPECIFIC AND PHYSICALLY LINKED TO THE LISTERIOLYSIN GENE" INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 59, Nr. 1, 1991, Seiten 65-72, XP002133545 in der Anmeldung erwähnt</p>	1,4,5
Y	<p>das ganze Dokument</p>	2,3,6-12
Y	<p>ROSSEN L ET AL: "A RAPID POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)-BASED ASSAY FOR THE IDENTIFICATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN FOOD SAMPLES" INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 14, 1. Januar 1991 (1991-01-01), Seiten 145-151, XP000198173 ISSN: 0168-1605 in der Anmeldung erwähnt</p>	2,3,6-12
	-/-	

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/06453

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 90 08841 A (GENE TRAK SYSTEMS) 9. August 1990 (1990-08-09) das ganze Dokument	
A	WO 92 01063 A (BIOLOG INC) 23. Januar 1992 (1992-01-23) das ganze Dokument	
A	WO 98 20160 A (HAZEL JAMES WILLIAM ; JENSEN MARK ANTON (US); DU PONT (US)) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument	
A	EP 0 576 842 A (MERCK PATENT GMBH) 5. Januar 1994 (1994-01-05) das ganze Dokument	
T	SCHEU ET AL.: "RAPID DETECTION OF LISTERIA MONOCYTOGENES BY PCR-ELISA" APPLIED MICROBIOLOGY, Bd. 29, Nr. 6, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 416-420, XP000892485 das ganze Dokument	1-12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06453

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9008841 A	09-08-1990	AU 5188190 A	24-08-1990
		CA 2025236 A	07-08-1990
		EP 0418346 A	27-03-1991
		JP 3504677 T	17-10-1991
		US 5376528 A	27-12-1994
WO 9201063 A	23-01-1992	US 5134063 A	28-07-1992
		AU 8230691 A	04-02-1992
		US 5374551 A	20-12-1994
WO 9820160 A	14-05-1998	US 5922538 A	13-07-1999
		AU 5100798 A	29-05-1998
		EP 0948643 A	13-10-1999
EP 0576842 A	05-01-1994	DE 4318450 A	16-12-1993
		JP 6233699 A	23-08-1994
		US 5932415 A	03-08-1999



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :

C12Q 1/68

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/14276

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

16. März 2000 (16.03.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06453

(22) Internationales Anmeldedatum: 2. September 1999 (02.09.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 40 044.6

2. September 1998 (02.09.98) US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTE-  
CON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE  
ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE];  
Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHEU, Pia [DE/DE];  
Boelckestrasse 45, D-12101 Berlin (DE). GASCH,  
Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, D-13359 Berlin  
(DE). BERGHOF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländerweg 85,  
D-12355 Berlin (DE).

(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer,  
Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN,  
IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO,  
RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE,  
LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen  
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen  
eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-  
richts:

25. Mai 2000 (25.05.00)

(54) Title: OLIGO NUCLEOTIDES, METHOD AND KIT FOR DETECTING *LISTERIA MONOCYTOGENES* BY AMPLIFYING  
AND/OR HYBRIDIZING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: OLIGONUKLEOTIDE, VERFAHREN UND KIT ZUR DETEKTION VON *LISTERIA MONOCYTOGENES* DURCH  
NUKLEINSÄUREAMPLIFIKATION UND/ODER -HYBRIDISIERUNG

(57) Abstract

The invention relates to a nucleic acid molecule or molecules and to a method for the quick and sensitive detection of bacteria of the  
pathogenic species *Listeria monocytogenes*. The invention also relates to a test kit or test kits for carrying out said detection method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum schnellen und sensitiven  
Nachweis von Bakterien der pathogenen Spezies *Listeria monocytogenes*. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits  
zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**BERICHTIGTE  
FASSUNG\***

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12Q 1/68</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/14276</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 16. März 2000 (16.03.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/06453 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 2. September 1999 (02.09.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 40 044.6      2. September 1998 (02.09.98)      US <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SCHEU, Pia [DE/DE]; Boelckestrasse 45, D-12101 Berlin (DE). GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, D-13359 Berlin (DE). BERGHOF, Komelia [DE/DE]; Rhodeländerweg 85, D-12355 Berlin (DE). <b>(74) Anwälte:</b> BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 25. Mai 2000 (25.05.00)
<b>(54) Title:</b> OLIGO NUCLEOTIDES, METHOD AND KIT FOR DETECTING <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> BY AMPLIFYING AND/OR HYBRIDIZING NUCLEIC ACIDS <b>(54) Bezeichnung:</b> OLIGONUKLEOTIDE, VERFAHREN UND KIT ZUR DETEKTION VON <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> DURCH NUKLEINSÄUREAMPLIFIKATION UND/ODER -HYBRIDISIERUNG <b>(57) Abstract</b> The invention relates to a nucleic acid molecule or molecules and to a method for the quick and sensitive detection of bacteria of the pathogenic species <i>Listeria monocytogenes</i> . The invention also relates to a test kit or test kits for carrying out said detection method. <b>(57) Zusammenfassung</b> Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum schnellen und sensitiven Nachweis von Bakterien der pathogenen Spezies <i>Listeria monocytogenes</i> . Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.		

\*(Siehe PCT Gazette Nr. 28/2000, "Section II")

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Oligonukleotide, Verfahren und Kit zur Detektion von *Listeria monocytogenes* durch Nukleinsäureamplifikation und/oder -hybridisierung

Erfindungsgemäß werden Oligonukleotide, Verfahren und Kit zur Detektion von *Listeria monocytogenes* durch Nukleinsäureamplifikation und/oder -hybridisierung bereitgestellt.

Die Gattung *Listeria* besteht aus den sechs Spezies *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seligeri* und *L. welshimeri*. Unter diesen sind nur Stämme der Spezies *L. monocytogenes* pathogen für den Menschen, insbesondere für Immungeschwächte, Ältere und Neugeborene. Die häufigsten Symptome der Listeriose sind Septikämie, Meningitis und Fehlgeburten. Infektionen durch *L. monocytogenes* werden vor allem durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel verursacht, insbesondere von Milchprodukten, Fleisch, Geflügel und Gemüse.

Eine Vielzahl von Verfahren zur Detektion von *L. monocytogenes* sind bekannt. Konventionelle Detektionsverfahren für *L. monocytogenes* bestehen aus einer Voranreicherung und nachfolgender Isolation von Kolonien auf Selektivmedien (Lovett et al., J. Food Protection **50** (1987), 188-192; McClain & Lee, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71** (1988), 660-664). Einzelkolonien werden nach ihrer Morphologie bzw. nach biochemischen oder serologischen Eigenschaften untersucht. Die Durchführung einer Analyse kann bis zu 6 - 8 Tage in Anspruch nehmen.

Da vor allem leicht verderbliche Nahrungsmittel häufig mit *L. monocytogenes* kontaminiert sind, wurden verschiedene Schnellverfahren zur Detektion von *L. monocytogenes* entwickelt. Diese Verfahren basieren entweder auf immunologischen Methoden oder der Anwendung von Nukleinsäuresonden.

Dabei kann die Detektion durch direkte Hybridisierung von Sonden an keimspezifische DNA bzw. RNA erfolgen (siehe z.B. Datta, A. R. et al., Appl. Environ. Microbiol. **53** (1987), 2256-2259). Der Nachteil bei solchen Verfahren ist die geringe Sensitivität, da mindestens  $10^5$ - $10^6$  Kopien der Zielnukleinsäure erforderlich sind. Dies kann durch Kombination mit einer Vervielfältigung der Zielsequenz, z.B. durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), ausgeglichen werden. Mehrere PCR-Verfahren zum Nachweis von *L. monocytogenes* sind in der Literatur beschrieben [zur Übersicht siehe z.B. Jones, D.D. & Bej, A.K. in "PCR Technology, Current Innovations", Griffin, H.G. & Griffin, A.M., Hrsg., (1994), 341-365]. Siehe auch die US Patente 4,683,195; 4,683,202 und 4,965,188. Ferner können die Ligase-Kettenreaktion [WO Veröffentlichung 89/09835], die „self-sustained sequence replication“ [EP 329,822], das „transcription based amplification system“

[EP 310,229] und das Q $\beta$  RNA-Replikase-System [US Patent 4,957,858] zur Amplifikation von Nukleinsäuren eingesetzt werden.

Es sind auch bereits einige Testkits zur Detektion mittels Antikörpern kommerziell erhältlich. Die meisten dieser Tests zeigen jedoch nur eine geringe Sensitivität und Spezifität.

Zur Detektion von spezifischen Mikroorganismen mittels Nukleinsäure-Hybridisierung oder -Amplifikation werden üblicherweise keimspezifische Oligonukleotide verwendet, deren Basensequenz für die DNA oder RNA eines spezifischen Mikroorganismus oder einer Gruppe von Mikroorganismen charakteristisch ist. Eine Hybridisierung an die DNA/RNA bzw. eine Amplifikation von DNA/RNA bei Einsatz dieser keimspezifischen Oligonukleotide (z.B. als Primer oder Sonden) mit den oben genannten Verfahren kann, unter geeigneten Reaktionsbedingungen, nur dann erfolgen, wenn die DNA/RNA der jeweils nachzuweisenden Mikroorganismen anwesend ist.

Die für *L. monocytogenes* beschriebenen Nachweisverfahren basieren überwiegend auf solchen Zielgenen, die eine Rolle in der Pathogenität von *L. monocytogenes* spielen. Es ist bekannt, daß einige dieser Gene in einem Virulenz-Gencluster benachbart auf dem Chromosom angeordnet sind. Da das Listeriolysin-Gen (*hlyA*) zuerst als eindeutig notwendig für die Pathogenität von *L. monocytogenes* erkannt wurde (Cossart, P. et al., Infect. Immun. 57 (1989), 3629-3636), basieren die meisten genotypischen Nachweisverfahren auf diesem Gen. Das *hlyA*-Gen kommt jedoch mit hoher Homologie auch bei apathogenen Listerien vor (i.e. bei *L. seeligeri* und *L. ivanovii*). Das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen ist bei diesen Nachweisverfahren nicht mit vollständiger Sicherheit auszuschließen, da einzelne Punktmutationen im Bereich der Bindungsstellen von Primern oder Sonden hierzu bereits ausreichen können.



Für das dem hlyA-Gen im Genom direkt benachbarte Metalloprotease-Gen (mpl) konnte gezeigt werden, daß es nur bei *L. monocytogenes* vorkommt, also nicht bei apathogenen Listerien (Domann, E. et al., Infect. Immun. **59** (1991), 65-72).

Die prinzipielle Eignung der das hlyA-Gen flankierenden DNA-Region zum Nachweis von *L. monocytogenes* mittels Hybridisierung oder Amplifikation ist beschrieben (Rossen, L. et al., Int. J. Food Microbiol. **14** (1991), 145-152), jedoch sind bisher für solche Nachweisverfahren keine Oligonukleotidsequenzen publiziert worden.

Die Sequenz des mpl-Gens von *L. monocytogenes* ist in der EMBL Datenbank unter der Accession Nummer X54619 beschrieben [Domann, E. et al., Infect. Immun. **59** (1991), 65-72]. Desweiteren sind Teile der Sequenz des mpl-Gens von *L. monocytogenes* in der EMBL Datenbank unter der Accession Nummer X60035 aufgeführt [Rasmussen, O. F. et al., Infect. Immun. **59** (1991), 3945-3951].

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es nun, ein routinegeeignetes Nachweisverfahren zu entwickeln, bei dem auch unter stark schwankenden Versuchsbedingungen beim jeweiligen Anwender die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten falsch-positiver Ergebnisse möglichst gering ist.

Insbesondere sollen Oligonukleotidsequenzen bereitgestellt werden, die in einem Nachweisverfahren für das Metallprotease-Gen (mpl) von *L. monocytogenes* eingesetzt werden können.

Diese Aufgaben werden durch die Bereitstellung von Nukleinsäuremolekülen der Sequenzen

(i) 5'-GAA AAA GCA TTT GAA GCC AT-3' oder



- (ii) 5'-GCA ACT TCC GGC TCA GC-3' oder
- (iii) 5'-TCG AAA AAG CAT TTG AAG CC-3' oder
- (iv) 5'-GGT CAG AGT GAA GCT CAT GT-3' oder
- (v) 5'-CTI TTC ACA TGA GCT TCA CTC TGA CCR A-3' oder
- (vi) 5'-CTT TTT CTT TCA CTG GGT TTC CGA CAT-3' oder
- (vii) 5'-GAT GAT TTC TTT TTC TTT CAC TGG ATT TCC AAT AT-3' oder
- (viii) der zu (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) und (vii) jeweils komplementären Sequenz gelöst.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können wie folgt definiert sein:

Oligonukleotid LM1: (Sequenz (i) = SEQ ID NO 1 entspricht der Position 2476 bis 2495 von *L. monocytogenes* [nach Domann, E. et al. Infect. Immun. 59 (1991), 65-72].

Oligonukleotid LM 2: (Sequenz (ii) = SEQ ID NO 2) entspricht der Position 2608 bis 2624 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LM 3: (Sequenz (iii) = SEQ ID NO 3) entspricht der Position 2474 bis 2493 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LM 4 (Sequenz (iv) = SEQ ID NO 4) entspricht der Position 2497 bis 2516 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LMR 1: (Sequenz (v) = SEQ ID NO 5) entspricht der Position 2495 bis 2522 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LMF 1: (Sequenz (vi) = SEQ ID NO 6) entspricht der Position 2525 bis 2551 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LMF 2: (Sequenz (vii) = SEQ ID NO 7) entspricht der Position 2525 bis 2559 von *L. monocytogenes*.

Zur Untersuchung, inwieweit Sequenzvariationen des *mpl*-Gens innerhalb der Spezies *L. monocytogenes* auftreten, wurde ein internes Fragment von 300 Basenpaaren von 13 *L. monocytogenes* Stämmen verschiedener Serovaren (2 Stämme der Serovaren 1/2a, 1 Stamm des Serovars 1/2b, 1 Stamm des Serovars 1/2c, 1 Stamm des Serovars 3a, 1 Stamm des Serovars 3b, 1 Stamm des Serovars 3c, 1

Stamm des Serovars 4a, 1 Stamm des Serovars 4a/b, 1 Stamm des Serovars 4b, 1 Stamm des Serovars 4c, 1 Stamm des Serovars 4d und 1 Stamm des Serovars 7) sequenziert. Anhand der Sequenzvergleiche wurde überraschenderweise gefunden, daß die Oligonukleotide LM1, LM 2, LM3, LM 4, LMF 1, LMF 2, LMR 1 sowie dazu komplementäre Sequenzen in Nachweisverfahren für *L. monocytogenes* zu hoch-spezifischen Nachweisen führen. Dabei werden die Oligonukleotide LM4, LMR 1, LMF 1 und LMF 2 bzw. die dazu komplementären Sequenzen vorzugsweise als Sonden verwendet.

Erfindungsgemäß werden insbesondere Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie bezüglich mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden ihrer Nukleotidkette

- (a) mit 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle (i) bis (viii) identisch sind oder
- (b) mit 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle (i) bis (viii) übereinstimmen oder
- (c) mit 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle (i) bis (viii) übereinstimmen oder
- (d) zu mindestens 90 % mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 homolog sind.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können eine für Sonden oder Primer übliche Länge aufweisen, insbesondere für eine PCR-Reaktion, sie können ferner eine durch Amplifikation, insbesondere durch eine PCR-Reaktion, herstellbare Länge aufweisen, und vorzugsweise können sie 10 bis 250 Basen und insbesondere 15 bis 30 Basen lang sind.

Sie können einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegen.

Geeignet als erfindungsgemäße keimspezifische Oligonukleotide zum Nachweis von *L. monocytogenes* sind also Nukleinsäuren, vorzugsweise 10 bis 250 Basen und insbesondere 15 bis 30 Basen lang, die mindestens in einer 10 Basen langen Sequenz mit den angegebenen Sequenzen LM 1, LM 2, LM 3, LM 4, LMF 1, LMF 2 und LMR 1 oder den hierzu komplementären Sequenzen übereinstimmen. Geringere Abweichungen (1 bis 2 Basen) in dieser 10 Basen langen Sequenz sind möglich, ohne daß die jeweils angegebene Spezifität bei der Amplifikation und/oder Hybridisierung verloren geht. Dem Fachmann ist bekannt, daß im Falle solcher geringeren Abweichungen die Reaktionsbedingungen entsprechend verändert werden müssen; vgl. beispielsweise T. Maniatis, Molecular Cloning, Herausgeber G. Sambrook & E.F. Fritsch, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

Zum Nachweis von *L. monocytogenes* werden Nukleinsäuren, vorzugsweise genomische DNA, zunächst aus den in einer zu untersuchenden Probe bzw. Bakterienkultur enthaltenen Zellen freigesetzt. Mittels Nukleinsäure-Hybridisierung kann dann, und zwar unter Einsatz der erfindungsgemäßen keimspezifischen Oligonukleotide als Sonde, der direkte Nachweis von keimspezifischen Nukleinsäuresequenzen in der zu untersuchenden Probe erfolgen. Geeignet hierzu sind verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren, wie z.B. "Southern blot" oder "dot blot".

Bevorzugt ist jedoch, vor allem wegen der höheren Empfindlichkeit, ein indirektes Nachweisverfahren, bei dem die gesuchten und wie vorstehend beschriebenen freigesetzten DNA/RNA-Sequenzen zunächst mittels der o.g. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, vorzugsweise PCR, amplifiziert werden.

Die Amplifikation von DNA/RNA unter Verwendung der genannten Verfahren erfolgt unter Einsatz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle als Primer. Dabei werden nur in dem Fall spezifische Amplifikate gebildet, in dem DNA/RNA von *L. monocytogenes*

anwesend ist. Durch eine Detektionsreaktion (nachgeschaltet bzw. während der Amplifikations-Reaktion) unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle als Sonden kann die Spezifität des Nachweisverfahrens erhöht werden. Für diese Detektionsreaktion ist ebenso die Verwendung von nicht vollständig keimspezifischen Oligonukleotiden möglich.

Alternativ kann die Nukleinsäure-Amplifikation auch in Anwesenheit eines oder mehrerer nicht vollständig spezifischer Oligonukleotide durchgeführt werden, so daß möglicherweise auch DNA/RNA anderer, nicht-nachzuweisender Mikroorganismen amplifiziert werden kann. Ein derartiges Amplifikationsverfahren ist in der Regel weniger spezifisch und sollte daher durch eine Detektionsreaktion (nachgeschaltet oder während der Amplifikations-Reaktion) mit einem oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül(e) als Sonde(n) abgesichert werden.

Erfindungsgemäß können verschiedene Verfahren eingesetzt werden, um die bei den indirekten Verfahren entstehenden Amplifikationsprodukte nachzuweisen. Dazu gehören u.a. an sich bekannte Verfahren wie die Visualisierung mittels Gelelektrophorese, die Hybridisierung von Sonden an immobilisierte Reaktionsprodukte [gekoppelt an Nylon- oder Nitrocellulose-Filter ("Southern blots") oder z.B. an "beads" oder Mikrotiterplatten] und die Hybridisierung der Reaktionsprodukte an immobilisierte Sonden (z.B. "reverse dot blots" oder mit Sonden gekoppelte "beads" oder Mikrotiterplatten). Zudem können Verfahren eingesetzt werden, bei dem ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle als Sonden im Verlauf der PCR-Reaktion ("online") spezifisch entstehende Amplifikationsprodukte qualitativ und quantitativ nachweisen können.

Erfindungsgemäß gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, mit denen die erfindungsgemäßen Oligonukleotide (z.B. Sonden und Primer) für die beschriebenen direkten oder indirekten Nachweisver-

fahren markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige, fluoreszierende oder anderweitig modifizierte bzw. modifizierende Gruppen enthalten, beispielsweise Antikörper, Antigene, Enzyme bzw. andere Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen. Sonden bzw. Primer können entweder natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte doppelsträngige oder einzelsträngige DNA oder RNA bzw. modifizierte Formen von DNA oder RNA, wie z.B. PNA sein (bei diesen Molekülen sind die Zucker-Einheiten durch Aminosäuren oder Peptide ausgetauscht). Einzelne oder mehrere Nukleotide der erfindungsgemäßen Sonden oder Primer können gegen analoge Bausteine (wie z.B. Nukleotide, die in der Ziel-Nukleinsäure nicht natürlich vorkommen) ersetzt sein. Insbesondere können bis zu 20 % von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden einer Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt werden.

Bei den o.g. indirekten Nachweisverfahren kann Detektion auch über ein intern-markiertes Amplifikat geführt werden. Dies kann z.B. über den Einbau von modifizierten (z.B. an Digoxigenin oder an Fluorescein gekoppelten) Nukleosidtriphosphaten während der Amplifikationsreaktion erfolgen.

Weiter wird erfindungsgemäß ein Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes*, bereitgestellt, der ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle enthält.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle bzw. die entsprechenden Kits können in einem Verfahren zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien der Spezies *L. monocytogenes* in einer Probe verwendet werden, wobei es sich bei dem Verfahren vorzugsweise um eine Nukleinsäurehybridisierung und/oder eine Nukleinsäureamplifikation, wie eine PCR, handelt. Dabei können nachzu-

weisende Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle unterschieden werden.

### Beispiele

**Beispiel 1:** Nachweis von Bakterien der Spezies *L. monocytogenes* mit der Polymerase-Kettenreaktion

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 10 bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurde dann in Gegenwart von je 0,4 µM Oligonukleotid LM 1 und LM 2, oder LM 3 und LM 2, 200 µM dNTP's (Boehringer Mannheim), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01% Tween 20 und 0,03 U/µl Taq DNA Polymerase (Biomaster) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 Zyklen	94 °C	30 sec
	57 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
Finale Synthese	72 °C	5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Die erwarteten Produkte von 149 bp bzw. 151 bp Länge wurden nur in den Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Spezies *L. monocytogenes* anwesend war. Die in den Gelen aufgetrennte DNA wurde mittels Standard-Methoden auf Nylon Filter transferiert und zur Überprüfung der Spezifität mit dem am 5'-Ende Digoxigenin-markierten Oligonukleotid LM 4 (Sequenz 4) hybridisiert. Die Hybridisierung



erfolgte in 5 x SSC, 2 % Blocking Reagenz, 0,1 % Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS und 5 pmol/ml Sonde für 4 h bei 60 °C. Gewaschen wurde in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 2 x 10 min bei 60 °C. Die Detektion erfolgte nach Standard-Methoden mittels Alkalischer Phosphatase Konjugate (Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment, Fa. Boehringer Mannheim) in Anwesenheit von 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Fa. Boehringer Mannheim).

Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor eine Bande von 149 bp bzw. 151 bp auf dem Agarosegel sichtbar war. Somit wurde mittels PCR und Hybridisierung die Anwesenheit sämtlicher 103 getesteten *L. monocytogenes* - Stämme nachgewiesen. Hingegen wurde keiner der getesteten nicht zu dieser Spezies gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfaßt.

**Tabelle 1:** Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden LM 1 und LM 2 (SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 2) bzw. LM 3 und LM 2 (SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 2) und jeweils nachfolgender Hybridisierung mit dem Oligonukleotid LM4 (SEQ ID NO 4)

Spezies	Serovar	Stamm-bezeichnung	LM1/LM2	LM2/LM3
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 767	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 768	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 5877	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 5828	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 6199	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		DSM 20650	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 5921	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7303	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7309	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7329	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 3954	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		DSM 20751	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 5326	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7160	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7161	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7167	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7168	-	-
<i>Listeria innocua</i>		DSM 20649	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 3408	-	-
<i>Listeria innocua</i>		NCTC 10528	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7139	-	-

<i>Listeria innocua</i>		NCTC 10528	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7139	-	-
<i>Listeria grayi</i>		DSM 20601	-	-
<i>Listeria grayi</i>		DSM 20596	-	-
<i>Listeria grayi</i>		BC 7308	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		DSM 20750	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2028	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2098	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2102	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2379	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 4121	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 4706	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 4770	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 5378	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		ATCC 19119	-	-
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19111	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19112	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19113	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19114	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19115	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19116	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19117	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19118	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 53	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 2479	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 2482	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 5835	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 4955	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 6204	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7149	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7150	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7153	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7165	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7195	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7196	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7197	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7198	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7973	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7053	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7054	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7055	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 6031	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7163	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7151	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7152	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7354	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7367	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7059	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 4950	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 6793	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7154	+	+



<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7290	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7352	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7355	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 4949	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7135	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7179	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 2540	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7140	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7381	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 c	SLCC 2471	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5069	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5070	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7083	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7065	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7069	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 4013	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7194	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7356	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7370	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7372	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7373	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7374	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 788	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7056	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7057	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7058	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7060	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7061	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7062	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7063	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7064	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7066	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7067	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7068	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7069	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7070	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7071	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7072	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7073	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7074	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7075	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7076	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7077	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7078	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7079	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7080	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7081	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7082	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7084	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7085	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7086	+	n.d.

<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7087	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7088	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7089	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7090	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7091	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7092	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4925	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4954	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6277	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6813	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6821	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6823	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 2375	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4926	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4952	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	7	SLCC 2622	+	+
<i>Arthrobacter spec.</i>		DSM 312	-	n.d.
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6051	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>		DSM 30040	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>		DSM 4595	-	n.d.
<i>Clostridium bifermentans</i>		DSM 630	-	n.d.
<i>Clostridium sporogenes</i>		IfGB 0303	-	n.d.
<i>Enterobacter agglomerans</i>		IfGB 0202	-	n.d.
<i>Enterobacter cloacae</i>		DSM 30054	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>		BC 674	-	n.d.
<i>Erwinia carotovora</i>		DSM 30168	-	n.d.
<i>Escherichia coli</i>		DSM 30083	-	n.d.
<i>Hafnia alvei</i>		IfGB 0101	-	n.d.
<i>Klebsiella oxytoca</i>		DSM 5175	-	n.d.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		DSM 2026	-	n.d.
<i>Lactobacillus spec.</i>		IfGB 1401	-	n.d.
<i>Lactob. bifermentans</i>		BC 8463	-	-
<i>Leuconostoc carnosum</i>		DSM 5576	-	n.d.
<i>Leucon. mesenteroides</i>		DSM 2146	-	n.d.
<i>Micrococcus citreus</i>		IfGB 0601	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>		DSM 348	-	-
<i>Pediococcus damnosus</i>		BC 505	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>		IfGB 51	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>		DSM 2041	-	n.d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 10145	-	n.d.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		IfGB 0301	-	-
<i>Salmonella spec.</i>		BC 2426	-	n.d.
<i>Salmonella typhimurium</i>		BC 2157	-	n.d.
<i>Serratia marcescens</i>		BC 677	-	-
<i>Shigella flexneri</i>		DSM 4782	-	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 6538	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i>		DSM 20380	-	n.d.
<i>Strept. faecalis</i>		DSM 20478	-	n.d.
<i>Strept. diacetylactis</i>		BC 2149	-	-
<i>Strept. thermophilus</i>		DSM 20259	-	n.d.
<i>Yersinia enterocolitica</i>		DSM 4780	-	n.d.

SLCC: H.P.R. Seeliger Listeria Culture Collection, Würzburg  
ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA  
DSM: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen  
GmbH, Braunschweig  
n.d.: nicht durchgeführt

**Beispiel 2:** Online-Detektion von Bakterien der Spezies *L. monocytogenes* mit der Polymerase-Kettenreaktion.

Aus Reinkulturen der in Tabelle 2 aufgeführten Stämme und Isolate wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 100 fg bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurden dann in Gegenwart von je 0,4 µM Oligonukleotid LM 1 und LM 2, je 0,2 µM LMF 1 (Markierung: 3'-Fluorescein), LMF 2 (Markierung: 3'-Fluorescein) und LMR 1 (Markierung: 5'-LC Red640 (Roche Diagnostics), 3'-Phosphat), 200 µM dNTP's (Roche Diagnostics) 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 µg/µl BSA (Roche Diagnostics), 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01% Tween 20 und 0,04 U/µl Taq DNA Polymerase (HTB) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem LightCycler der Firma Roche Diagnostics GmbH mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
42 Zyklen	97 °C	0 sec
	59 °C	40 sec

Während der PCR-Reaktion wurden Fluoreszenz-Signale (Detektions-Wellenlänge 640 nm) nur in den Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Spezies *L. monocytogenes* anwesend war.

**Tabelle 2:** Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden LM 1 und LM 2 (Seq ID NO 1 und SEQ ID NO 2) und jeweils während der Amplifikationsreaktion erfolgenden Hybridisierung mit den Oligonukleotiden LMF 1, LMF 2 und LMR 1 (SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7)

Spezies	Serovar	Stamm-be- zeichnung	LM1/LM2 LMF1/LMF2/LMR1
<i>Bacillus staeroth.</i>		DSM 456	-
<i>Staphylococcus aureus</i>		BC 197	-
<i>Escherichia coli</i> (VTEC)		BC 8318	-
<i>Clostridium perfringens</i>		BC 8799	-
<i>Leuconostoc mesent.</i>		DSM 20241	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 767	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 768	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 5877	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 5921	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7309	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 5326	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7160	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7161	-
<i>Listeria gravi</i>		DSM 20601	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2028	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2098	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2102	-
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 4955	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 6204	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7149	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7150	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7153	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7151	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7152	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7354	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7367	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7059	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 6793	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7154	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7290	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7352	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7355	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 4949	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7135	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7179	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7140	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7381	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 c	SLCC 2471	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5069	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5070	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7083	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7065	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7069	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 4013	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7194	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7356	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7370	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7372	+

<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4925	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4954	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6277	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6813	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6821	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 2375	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4926	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4952	+
<i>L. monocytogenes</i>	7	SLCC 2622	+

IfGB: Institut für Gärungsgewerbe Berlin  
BC: BioteCon Stammsammlung  
SLCC: H.P.R. Seeliger Listeria Culture Collection, Würzburg  
ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA  
DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen  
GmbH, Braunschweig

**Patentansprüche**

1. Nukleinsäuremolekül, dadurch **gekennzeichnet**, daß es bezüglich mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette

(i) mit 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Nukleinsäuremoleküle gemäß a), b), c), d), e), f), g) oder h) identisch ist:

- a) der SEQ ID NO 1 5'-GAA AAA GCA TTT GAA GCC AT-3' oder
- b) der SEQ ID NO 2 5'-GCA ACT TCC GGC TCA GC-3' oder
- c) der SEQ ID NO 3 5'-TCG AAA AAG CAT TTG AAG CC-3' oder
- d) der SEQ ID NO 4 5'-GGT CAG AGT GAA GCT CAT GT-3' oder
- e) der SEQ ID NO 5 5'-CTI TTC ACA TGA GCT TCA CTC TGA CCR A-3' oder
- f) der SEQ ID NO 6 5'-CTT TTT CTT TCA CTG GGT TTC CGA CAT-3' oder
- g) der SEQ ID NO 7 5'-GAT GAT TTC TTT TTC TTT CAC TGG ATT TCC AAT AT-3' oder
- h) der zu a), b), c), d), e), f) und g) jeweils komplementären Sequenz; oder

(ii) mit 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Nukleinsäuremoleküle gemäß (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) oder (h) übereinstimmt oder

(iii) mit 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Nukleinsäuremoleküle gemäß (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) oder (h) übereinstimmt oder



- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) oder (h) homolog ist.

2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, **gekennzeichnet** durch eine für Sonden oder Primer übliche Länge, insbesondere für eine PCR-Reaktion, insbesondere einer Länge von 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden.

3. Nukleinsäuremolekül

- a) der SEQ ID NO 1 5'-GAA AAA GCA TTT GAA GCC AT-3' oder
- b) der SEQ ID NO 2 5'-GCA ACT TCC GGC TCA GC-3' oder
- c) der SEQ ID NO 3 5'-TCG AAA AAG CAT TTG AAG CC-3' oder
- d) der SEQ ID NO 4 5'-GGT CAG AGT GAA GCT CAT GT-3' oder
- e) der SEQ ID NO 5 5'-CTI TTC ACA TGA GCT TCA CTC TGA CCR A-3' oder
- f) der SEQ ID NO 6 5'-CTT TTT CTT TCA CTG GGT TTC CGA CAT-3' oder
- g) der SEQ ID NO 7 5'-GAT GAT TTC TTT TTC TTT CAC TGG ATT TCC AAT AT-3' oder
- h) der zu a), b), c), d), e), f) und g) jeweils komplementären Sequenz.

4. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.

5. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es

- (i) als DNA-Sequenz oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA-Sequenz oder



(iii) als PNA-Sequenz vorliegt,

wobei das Nukleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

6. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß bis zu 20 % von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

7. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nukleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

8. Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes*, **gekennzeichnet** durch ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.

9. Verwendung eines oder mehrerer Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder eines Kits gemäß Anspruch 8 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes*.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Nukleinsäurehybridisierung und/oder eine Nukleinsäureamplifikation durchführt.

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion für die Nukleinsäureamplifikation durchführt.

12. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines der Nukleinsäuremoleküle gemäß Anspruch 3 unterscheidet.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
**PCT/EP 99/06453**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ID: SPU97390, July 1997 (1997-07) JANG: "SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE 40S RIBOSOMAL PROTEIN S4 HOMOLOG mRNA PARTIAL CDS" XP002133546 abstract</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: T36015, April 1997 (1997-04) ARUFFO ET AL.: "ANTISENSE PRIMER FOR SIGNAL PEPTIDE REGION OF HUMANISED ANTIBODY" XP002133547 abstract</p>	1,2,4,5

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**20 March 2000**

Date of mailing of the international search report

**06/04/2000**

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

**Hagenmaier, S**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.  
PCT/EP 99/06453

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ID/AC: A42883, March 1997 (1997-03) ABKEN ET AL: "SEQUENCE 15 FROM W09502701 "METHOD OF IDENTIFYING HUMAN AND ANIMAL CELLS CAPABLE OF UNLIMITED PROLIFERATION OR TUMOUR FORMATION" XP002133548 abstract</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: T47423, September 1997 (1997-09) SHUBER: "PRIMER #4 FOR TAY-SACHS DISEASE GENE" XP002133549 abstract</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ID/AC: AA657460, November 1997 (1997-11) EMMERT-BUCK: "Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1203441" XP002133550 abstract</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: Q20004, December 1991 (1991-12) MATTEUCCI: "TARGET DUPLEX FOR COVALENTLY CROSS-LINKING OLIGONUCLEOTIDES" XP002133551 abstract</p>	1,2,4,5
X	<p>DOMANN ET AL.: "MOLECULAR CLONING, SEQUENCING AND IDENTIFICATION OF A METALLOPROTEASE GENE FROM LISTERIA MONOCYTOGENES THAT IS SPECIES SPECIFIC AND PHYSICALLY LINKED TO THE LISTERIOLYSIN GENE" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 59, no. 1, 1991, pages 65-72, XP002133545 cited in the application</p>	1,4,5
Y	<p>the whole document</p>	2,3,6-12
Y	<p>ROSSEN L ET AL: "A RAPID POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)-BASED ASSAY FOR THE IDENTIFICATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN FOOD SAMPLES" INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 14, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 145-151, XP000198173 ISSN: 0168-1605 cited in the application</p>	2,3,6-12
	-/-	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No  
PCT/EP 99/06453

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 08841 A (GENE TRAK SYSTEMS) 9 August 1990 (1990-08-09) the whole document	
A	WO 92 01063 A (BIOLOG INC) 23 January 1992 (1992-01-23) the whole document	
A	WO 98 20160 A (HAZEL JAMES WILLIAM ;JENSEN MARK ANTON (US); DU PONT (US)) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document	
A	EP 0 576 842 A (MERCK PATENT GMBH) 5 January 1994 (1994-01-05) the whole document	
T	SCHEU ET AL.: "RAPID DETECTION OF LISTERIA MONOCYTOGENES BY PCR-ELISA" APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 29, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 416-420, XP000892485 the whole document	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Application No

PCT/EP 99/06453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9008841 A	09-08-1990	AU 5188190 A CA 2025236 A EP 0418346 A JP 3504677 T US 5376528 A	24-08-1990 07-08-1990 27-03-1991 17-10-1991 27-12-1994
WO 9201063 A	23-01-1992	US 5134063 A AU 8230691 A US 5374551 A	28-07-1992 04-02-1992 20-12-1994
WO 9820160 A	14-05-1998	US 5922538 A AU 5100798 A EP 0948643 A	13-07-1999 29-05-1998 13-10-1999
EP 0576842 A	05-01-1994	DE 4318450 A JP 6233699 A US 5932415 A	16-12-1993 23-08-1994 03-08-1999

**PCT/EP 99/06453**

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHERTE GEBIETE

**Recherchierte(r) Mindestanforderung(en) (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)**

Recherchierte aber nicht zum Mindestarbeitslohn gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

### C. ALS WESENTLICH ANGEBEHÖRENDE UNTERLAGEN

**X** Siehe Anhang Patentfamilie

• **Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen** :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

2. Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie auszuführt)

**"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht**

**\*P\*** Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

**T** Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angedeutet ist

**"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden**

**Y\*** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann zureichend ist

**"8" Veröffentlichung, die Mithode derselben Patentfamilie ist**

**Datum des Abschlusses der internationalen Recherche**

### Abstractum des internationalen Forschungsberichts

**20. März 2000**

06/04/2000

**Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde**  
**Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2**  
**NL - 2280 HV Rijswijk**  
**Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,**  
**Fax: (+31-70) 340-3016**

## Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S



# INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Int. Joneses Albenzeichen  
PCT/EP 99/06453

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ID/AC: A42883, März 1997 (1997-03) ABKEN ET AL: "SEQUENCE 15 FROM W09502701 "METHOD OF IDENTIFYING HUMAN AND ANIMAL CELLS CAPABLE OF UNLIMITED PROLIFERATION OR TUMOUR FORMATION" XP002133548 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: T47423, September 1997 (1997-09) SHUBER: "PRIMER #4 FOR TAY-SACHS DISEASE GENE" XP002133549 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ID/AC: AA657460, November 1997 (1997-11) EMMERT-BUCK: "Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1203441" XP002133550 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! ID/AC: Q20004, Dezember 1991 (1991-12) MATTEUCCI: "TARGET DUPLEX FOR COVALENTLY CROSS-LINKING OLIGONUCLEOTIDES" XP002133551 Zusammenfassung</p>	1,2,4,5
X	<p>DOMANN ET AL.: "MOLECULAR CLONING, SEQUENCING AND IDENTIFICATION OF A METALLOPROTEASE GENE FROM LISTERIA MONOCYTOGENES THAT IS SPECIES SPECIFIC AND PHYSICALLY LINKED TO THE LISTERIOLYSIN GENE" INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 59, Nr. 1, 1991, Seiten 65-72, XP002133545 in der Anmeldung erwähnt</p>	1,4,5
Y	<p>das ganze Dokument</p>	2,3,6-12
Y	<p>ROSSEN L ET AL: "A RAPID POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)-BASED ASSAY FOR THE IDENTIFICATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN FOOD SAMPLES" INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 14, 1. Januar 1991 (1991-01-01), Seiten 145-151, XP000198173 ISSN: 0168-1605 in der Anmeldung erwähnt</p>	2,3,6-12
	-/-	

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Int. Anzeichen  
PCT/EP 99/06453

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 90 08841 A (GENE TRAK SYSTEMS) 9. August 1990 (1990-08-09) das ganze Dokument	
A	WO 92 01063 A (BIOLOG INC) 23. Januar 1992 (1992-01-23) das ganze Dokument	
A	WO 98 20160 A (HAZEL JAMES WILLIAM ; JENSEN MARK ANTON (US); DU PONT (US)) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument	
A	EP 0 576 842 A (MERCK PATENT GMBH) 5. Januar 1994 (1994-01-05) das ganze Dokument	
T	SCHEU ET AL.: "RAPID DETECTION OF LISTERIA MONOCYTOGENES BY PCR-ELISA" APPLIED MICROBIOLOGY, Bd. 29, Nr. 6, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 416-420, XP000892485 das ganze Dokument	1-12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06453

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9008841 A	09-08-1990	AU 5188190 A	24-08-1990
		CA 2025236 A	07-08-1990
		EP 0418346 A	27-03-1991
		JP 3504677 T	17-10-1991
		US 5376528 A	27-12-1994
WO 9201063 A	23-01-1992	US 5134063 A	28-07-1992
		AU 8230691 A	04-02-1992
		US 5374551 A	20-12-1994
WO 9820160 A	14-05-1998	US 5922538 A	13-07-1999
		AU 5100798 A	29-05-1998
		EP 0948643 A	13-10-1999
EP 0576842 A	05-01-1994	DE 4318450 A	16-12-1993
		JP 6233699 A	23-08-1994
		US 5932415 A	03-08-1999